

運動が炎症誘発性筋力低下を抑制する 分子機構の解明

名古屋市立大学大学院 檜 森 弘 一

Mechanisms of Exercise-Induced Improvement of Muscle Dysfunction in Polymyositis

by

Koichi Himori

Graduate School of Sciences, Nagoya-City University

ABSTRACT

In the present study, we investigated the role of p62 in exercise-induced adaptation in muscle of experimental autoimmune myositis (EAM) mice, a widely used animal model for polymyositis. C57BL/6J mice were immunized with myosin to induce EAM and subjected to voluntary running exercise for 4 weeks. Voluntary running exercise increased the levels of phospho-p62 and improved endurance performance but not muscle mass and strength in EAM mice. Moreover, EAM was induced in muscle-specific p62 knockout and wild-type littermates mice. The induction of EAM resulted in significant decreases in muscle mass, strength, and endurance performance in wild-type and p62 knockout mice, without any difference between genotypes. These results suggest that voluntary running exercise improves endurance performance in EAM mice independent of p62 function.

キーワード

自発性走行運動, 多発性筋炎, オートファジー関連タンパク質, 持久性運動能力,
炎症誘発性筋力低下

Keyword

Voluntary running exercise, Polymyositis, Autophagy-related proteins, Endurance performance, Inflammation-induced muscle dysfunction

要 旨

本研究では、多発性筋炎のモデル動物である実験的自己免疫性筋炎 (experimental autoimmune myositis: EAM) マウスを用い、当該マウスに対する自発性走行運動の効果における p62 の役割を検討した。C57BL/6J マウスにミオシタンパクで免疫することで EAM を誘導し、4 週間の自発性走行運動を負荷したところ、p62 のリン酸化を増大し、EAM マウスの持久性運動能力を改善したが、筋量や筋力は改善しなかった。また、筋特異的 p62 欠損マウスと野生型マウスに EAM を誘導した結果、EAM マウスにおける筋量、筋力および持久性運動能力は、野生型と筋特異的 p62 欠損マウスの間に違いはなかった。これらの結果から、自発性走行運動は EAM による持久性運動能力を改善するが、その適応機序に p62 は関与しない可能性が示唆された。

緒 言

特発性炎症性筋疾患である多発性筋炎では、自己免疫機序により筋組織が傷害され、著しい筋量、筋力や筋持久力の低下が引き起こされる¹⁾。多発性筋炎患者におけるこれらの筋の退行性変化は、日常生活活動を制限し²⁾、生活の質の低下をもたらすため³⁾、そのメカニズムを解明し、有効な治療法を確立することは重要な課題である。多発性筋炎による筋の退行性変化には、酸化ストレスの増大が重要な役割を果たすことが報告されているが⁴⁾、その詳細なメカニズムは未だ十分には解明されておらず、有効な治療法も確立されていない。

近年、多発性筋炎患者に対する持久性運動が症

状を増悪させずに筋の退行性変化を改善することが複数報告されており、多発性筋炎患者に対する運動療法の有効性を示す知見が蓄積されつつある⁵⁻⁷⁾。ただし、持久性運動が多発性筋炎による筋の退行性変化を改善するメカニズムについては十分に理解されていない。一方、先行研究において、持久性運動はオートファジー関連タンパク質である p62 を介して骨格筋における抗酸化酵素を増加させることが報告されている⁸⁾。したがって、多発性筋炎による筋の退行性変化に酸化ストレスの増大が関与することから考えると、多発性筋炎患者に対する持久性運動の効果に p62 が重要な役割を果たす可能性が考えられる。

そこで本研究では、まず、多発性筋炎のモデル動物である実験的自己免疫性筋炎 (experimental autoimmune myositis: EAM) マウスにおける筋量、筋力や持久性運動能力の低下に対する持久性運動の効果と p62 の変動を検討した。次に、EAM による筋の退行性変化における p62 の役割を検証した。

1. 研究方法

1. 1 実験動物および多発性筋炎モデルマウスの作製方法

実験には 8 週齢の雌性 C57BL/6J マウス、筋特異的 p62 欠損マウスおよびその野生型マウスを使用した。筋特異的 p62 欠損は、ニューヨーク大学の Steven J. Burden 教授より供与された *mlc1f Cre* マウスと筑波大学の柳川徹教授より供与された *p62 flox* マウスを交配し作製した。餌と水は自由摂取とし、明暗サイクル、温度 (23 度) や湿度 (50%) が管理された名古屋市立大学実験動物研

究教育センターにてマウスを飼育した。すべての動物実験は、名古屋市立大学医学研究科動物実験委員会の承認を得て実施した。運動介入実験では、C57BL/6Jマウスを実験的自己免疫性筋炎 (EAM) 群と対照 (CNT) 群に分け、さらに安静群と運動群に分けた。遺伝子組換え実験では、筋特異的 p62 欠損 (p62mKO) マウスとその野生型 (WT) マウスを EAM 群と CNT 群に分けた。EAM は、抗原 (ラット由来ミオシン) とフロイント完全アジュバントを等量混合したエマルジョンを1週間毎に3回投与することで惹起した⁹⁾。

1. 2 運動方法

運動群は、エマルジョンの最終投与翌日からケージ内に回転ホイールを設置し、4週間の自発走行運動トレーニングを実施した。運動群はトレーニング期間中の走行距離を継続的に測定し、運動を十分に実施したマウスのみを解析に使用した。安静群は、運動群がトレーニングを実施する期間中、飼育ケージ内にて通常飼育した。

1. 3 四肢握力評価

四肢握力の測定には小動物用握力計 (GPM-101B, Melquest, Toyama, Japan) を用いた。グリップバーにマウスの四肢を把持させ、尾部を後方に牽引し、発揮されたピークの張力値 (g) を記録した。測定は5回3セット行い、最大値を各個体の四肢握力とした。

1. 4 持久性運動能力テスト

小動物用トレッドミルを用いて持久性運動能力を評価した。テスト前日までの3日間は、トレッドミル走行に馴化させるため、13.4 m/min の速度で10分間走行させた。持久性運動能力テストでは、傾斜5度とし、速度は13.4 m/min から開始して、30分ごとに2.7 m/min ずつ速度を漸増し、マウスが疲労困憊状態に至るまでの総走行距離を算出した。

1. 5 検体採取

運動介入実験では、運動期間最終日の一過性の運動の影響を取り除くため、運動期間終了24時間後に、遺伝子組換え実験では、エマルジョンの最終投与から2週後にマウスを解剖し検体を採取した。解剖はマウスを麻酔下で頸椎脱臼し安楽死させた後、腓腹筋および足底筋を採取し筋重量を測定した。その直後に液体窒素にて凍結し実験に使用するまで-80度にて凍結保存した。

1. 6 ウェスタンブロット

タンパク質の評価にはウェスタンブロット法を使用した。方法は、凍結保存した足底筋をウェスタンブロット用のサンプルバッファーに懸濁しタンパク濃度を測定した。測定後、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動しタンパク質を分離した。分離後、タンパクはメンブレンに転写し、p-p62 Ser351 (PM074, MBL Life Science, Nagoya, Japan), p-p62 Ser403 (D343, MBL Life Science), p62 (p0067, MilliporeSigma, Burlington, MA, USA), Copper-Zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) (ab16831, Abcam, Cambridge, United Kingdom), Manganese (Mn) SOD (ab13534, Abcam), および Extracellular (Ec) SOD (AF4817, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) (AB3242, MilliporeSigma), Cytochrome c oxidase subunit IV (COX IV) (4844, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Myosin heavy chain (MHC) IIa (SC-71, DSHB, Iowa City, IA), MHC IIb (BF-F3, DSHB) の一次抗体と反応させた。反応後、各メンブレンは一次抗体に対応したHRPラベルした二次抗体と反応させ、検出試薬にて発色レイメージングアナライザー (LAS500, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) で観察した。なお、タンパク発現量はPonceau-S染色によるバンド強

度で補正した。

1. 7 統計

統計は、EAMを誘導したWTマウスとp62mKOマウスにおける持久性運動能力の比較には対応のないt検定を使用した。その他の測定結果の比較には2元配置分散分析を使用し、有意差が認められた場合にはpost-hoc testとして多重比較 (Turkey法) を実施した。有意水準は5%とした。

2. 研究結果

2. 1 4週間の自発走行運動は、EAMによる持久性運動能力の低下を改善し、p62のリン酸化を増大させる

マウスの体重は、すべての群で違いはなかった (図1A)。腓腹筋の筋重量、四肢握力は、EAMにより低下し、これらの変化は安静群と運動群の間に違いはなかった (図1BC)。持久性運動能力テストにおける総走行距離は、EAMにより減少する傾向がみられた。また、EAMマウスにおける総走行距離は運動により増加した (図1D)。図2Aに足底筋におけるウェスタンブロットの代表的な撮画像を示した。EAMマウスにおけるp62

のSer351リン酸化は、運動により増加する傾向がみられ、p62のSer403リン酸化は、運動により増加した (図2B)。抗酸化酵素であるCuZnSODおよびEcSODの発現は、CNTおよびEAMマウスで運動により増加する傾向がみられ、MnSODの発現は、CNTおよびEAMマウスで運動により増加した (図2C)。ミトコンドリア生成やミトコンドリア量の指標であるPGC-1 α の発現は、CNTマウスで運動により増加し、COX IVの発現は、運動により増加する傾向がみられた。また、EAMマウスにおけるPGC-1 α とCOX IVの発現は、運動により増加する傾向がみられた。MHC IIaの発現は、CNTマウスで運動により増加し、EAMマウスで運動により増加する傾向がみられた。MHC IIbの発現は、CNTおよびEAMマウスで運動により減少した (図2D)。

2. 2 p62の欠損は、EAMによる筋量、筋力および持久性運動能力の低下に影響を及ぼさない

マウスの体重は、すべての群で違いはなかった (図3A)。腓腹筋の筋重量、四肢握力は、EAMにより低下し、これらの変化に遺伝子型による違

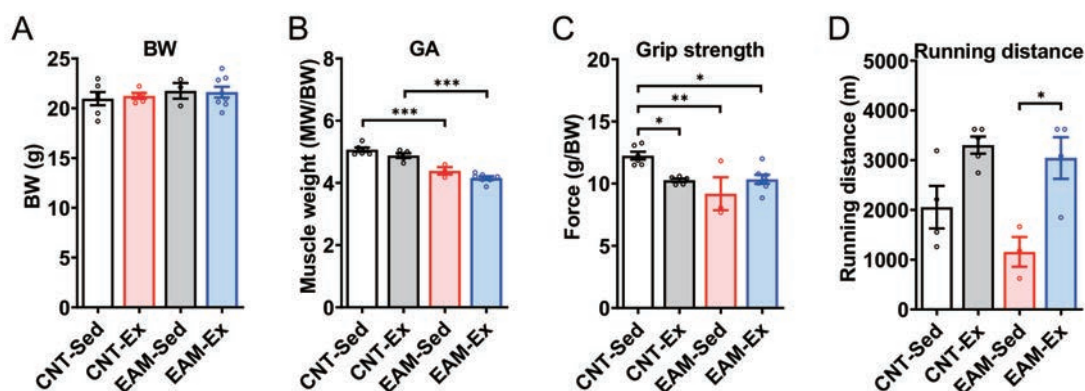


図1 自発性走行運動がEAMによる筋の退行性変化に及ぼす影響

A) 体重 (BW) ; B) 腓腹筋 (GA) の筋重量 (体重で補正) ; C) 四肢握力 (体重で補正) ; D) 持久性運動能力テストにおける総走行距離。CNT-Sed:安静対照群, CNT-Ex:運動対照群, EAM-Sed:安静実験的自己免疫性筋炎群, EAM-Ex:運動実験的自己免疫性筋炎群。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

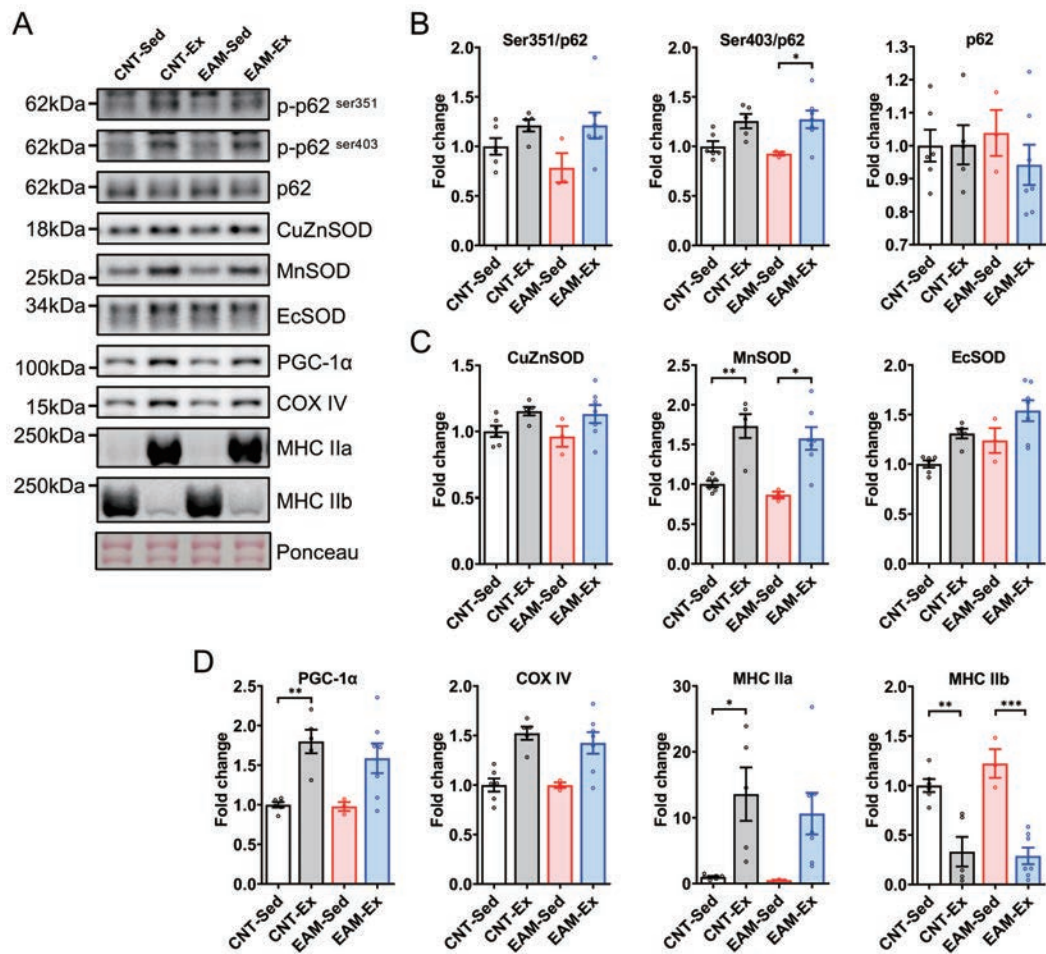


図2 自発性走行運動がEAMマウス骨格筋のタンパク発現に及ぼす影響

A) 足底筋におけるウェスタンブロットの代表的な撮影像; B) リン酸化p62およびp62の変動; C) 抗酸化酵素の変動; D) ミトコンドリア関連タンパク質およびミオシン重鎖の変動. CNT-Sed:安静対照群, CNT-Ex:運動対照群, EAM-Sed:安静実験的自己免疫性筋炎群, EAM-Ex:運動実験的自己免疫性筋炎群. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

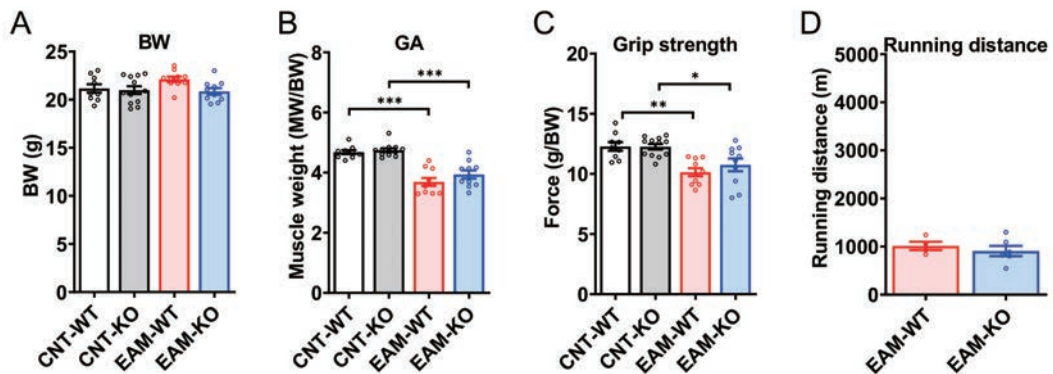


図3 筋特異的p62欠損がEAMによる筋の退行性変化に及ぼす影響

A) 体重 (BW) ; B) 腓腹筋 (GA) の筋重量 (体重で補正) ; C) 四肢握力 (体重で補正) ; D) 持久性運動能力テストにおける総走行距離. CNT-WT:野生型対照群, CNT-KO:筋特異的p62欠損対照群, EAM-WT:野生型実験的自己免疫性筋炎群, EAM-KO:筋特異的p62欠損実験的自己免疫性筋炎群. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

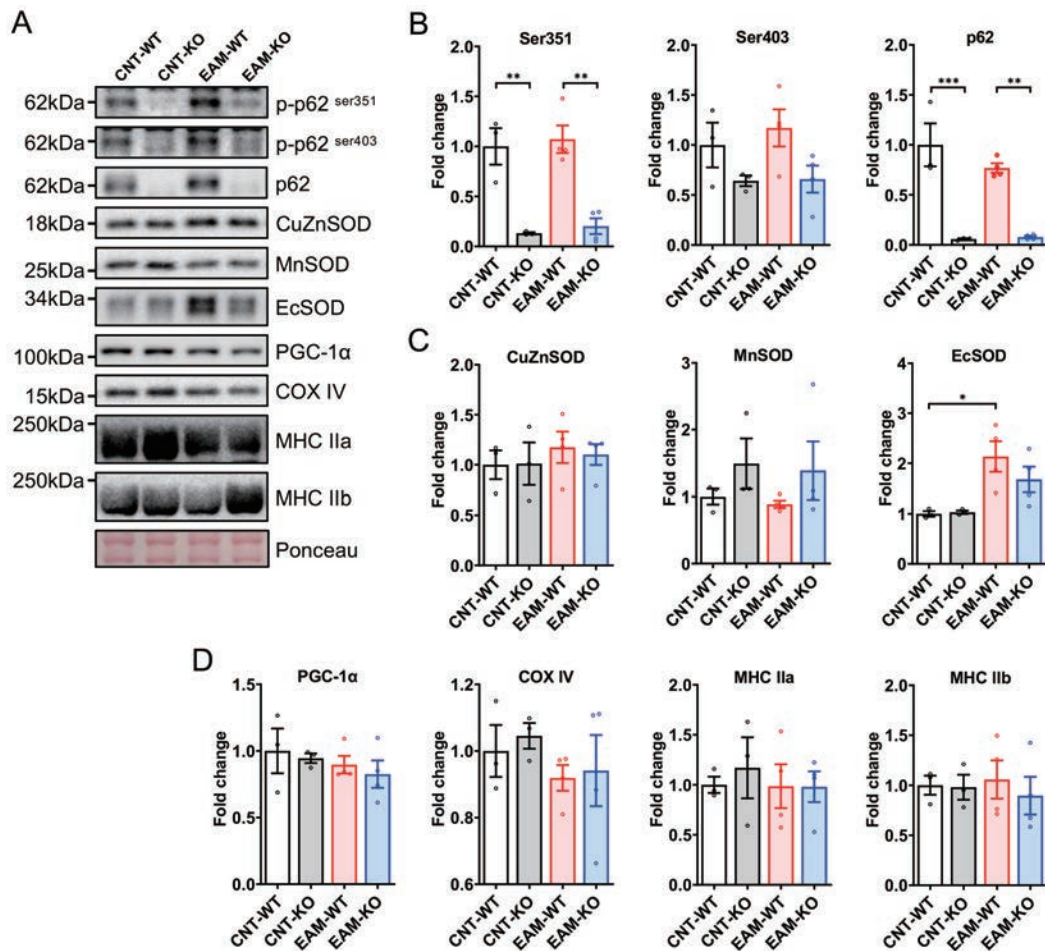


図4 筋特異的p62欠損がEAMマウス骨格筋のタンパク発現に及ぼす影響

A) 足底筋におけるウェスタンブロットの代表的な撮画像: B) リン酸化p62およびp62の変動: C) 抗酸化酵素の変動: D) ミトコンドリア関連タンパク質およびミオシン重鎖の変動. CNT-WT:野生型対照群, CNT-KO:筋特異的p62欠損対照群, EAM-WT:野生型実験的自己免疫性筋炎群, EAM-KO:筋特異的p62欠損実験的自己免疫性筋炎群. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

いはなかった (図3BC). EAM群における持久性運動能力は、遺伝子型による違いはなかった (図3D). 図4Aに足底筋におけるウェスタンブロットの代表的な撮画像を示した. p62およびp62のSer351リン酸化は、CNTおよびEAM群においてp62mKOマウスで低下した (図4B). p62のSer403リン酸化は、CNTおよびEAMマウスにおいてp62mKOマウスで低下する傾向がみられた. CuZnSOD, MnSOD, PGC-1 α , COX IV, MHC IIa, およびMHC IIbの発現は、すべての群で違いはなかった (図4CD). EcSODの発現は、WT

マウスにおいてEAMにより増加した (図4C).

3. 考察

EAMマウスの骨格筋におけるp62のリン酸化や抗酸化酵素の発現は、4週間の自発性走行運動により増加したものの、筋量や筋力の低下は改善しなかった. これらの結果から、筋量や筋力については、そもそも運動効果が得られず、自発性走行運動によるリン酸化p62の増加は筋量や筋力の改善に寄与しない可能性が高い. 自発性走行運動によりEAMマウスにおける筋量や筋力の低下が

改善されなかった理由について、抗酸化剤であるN-アセチルシステインの投与がEAMによる筋力の低下を改善することが報告されている一方で⁴⁾、EAMによる筋量や筋力の低下には複数の要因が関係することが指摘されていることから¹⁰⁾、走行運動が酸化ストレス以外の要因に作用しなかったか、あるいは、走行運動による抗酸化酵素の増大が、EAMによる筋量や筋力を改善するには不十分であった可能性が考えられる。

本研究における4週間の自発性走行運動は、p62のリン酸化を増大するとともにEAMによる持久性運動能力の低下を改善した。本研究では、EAMマウスにおけるCOX IVの低下が観察されなかったため、EAMによる持久性運動能力低下の要因をミトコンドリア量の減少では説明できず、明らかにすることはできなかった。一方、EAMマウスの骨格筋では、走行運動によりPGC-1 α とCOX IVの増加およびMHC IIaの増加とMHC IIbの減少が観察された。そのため、走行運動はEAMマウスの骨格筋におけるミトコンドリア生合成の促進によるミトコンドリア量の増加やMHC IIb線維に比べて酸化的リン酸化能力に優れたMHC IIa線維の増加を介して持久性運動能力を改善したと推察される。ミトコンドリアとp62の関連性について、先行研究ではp62のリン酸化がParkin依存性マイトファジーにおけるポリユビキチン化されたミトコンドリアの分解に重要であることが示されており^{11,12)}、p62がミトコンドリアの品質維持に関与すると考えられている。しかしながら、PGC-1 α を介したミトコンドリア量の増加に対するp62の役割を直接検証した報告はなく、自発性走行運動によるp62のリン酸化が、ミトコンドリア量の増加に寄与するかどうかについてはさらなる検討が必要である。

さらに本研究では、EAMマウスに対する運動効果におけるp62の重要性を確認するため、p62mKOマウスにEAMを誘導した。その結果、

p62mKOマウスでもWTマウスと同様にEAMによる筋量、筋力、持久性運動能力の低下が引き起こされ、遺伝子型による違いはなかった。また、リン酸化p62の発現はp62mKOマウスで著しく低下するものの、PGC-1 α 、COX IVおよびMHCの発現は遺伝子型による違いがなかった。これらの結果から、自発性走行運動によって生じたEAMマウスの骨格筋における適応的变化にp62は関与しない可能性が示唆された。

3. 結 論

本研究では、EAMに対する自発性走行運動の適応的变化におけるp62の役割を検討した。自発性走行運動は、EAMマウスの骨格筋におけるp62のリン酸化を増加させるが、筋量や筋力を改善しないため、筋量や筋力については、運動効果にp62が関与しない可能性が高い。一方、自発性走行運動は、PGC-1 α 、ミトコンドリア酵素およびMHC IIa線維の発現を増大し、EAMマウスの持久性運動能力を改善した。しかしながら、EAMを誘導したWTとp62mKOマウスの間で、持久性運動能力や上記タンパクの発現に違いがなかったことから、持久性運動能力についても、運動効果はp62を介さないと考えられる。

謝 辞

本研究は、公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団の助成を受けて実施しました。深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Yazici Y., and Kagen L. J., Clinical presentation of the idiopathic inflammatory myopathies, *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 28: 823-832 (2002)
- 2) Oldroyd A., Dixon W., Chinoy H., and Howells K., Patient insights on living with idiopathic inflammatory myopathy and the limitations of disease activity measurement methods - a qualitative

- study, *BMC Rheumatol.*, **4**: 47 (2020)
- 3) Panyi A., Borgulya G., Constantin T., Vancsa A., Gergely L., and Danko K., Functional outcome and quality of life in adult patients with idiopathic inflammatory myositis, *Rheumatology (Oxford)*, **44**: 83-88 (2005)
 - 4) Meyer A., Laverny G., Allenbach Y., Grelet E., Ueberschlag V., Echaniz-Laguna A., Lannes B., Alsaleh G., Charles A. L., Singh F., Zoll J., Lonsdorfer E., Maurier F., Boyer O., Gottenberg J. E., Nicot A. S., Laporte J., Benveniste O., Metzger D., Sibilia J., and Geny B., IFN-beta-induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis, *Acta. Neuropathol.*, **134**: 655-666 (2017)
 - 5) Alemo Munters L., Dastmalchi M., Katz A., Esbjornsson M., Loell I., Hanna B., Liden M., Westerblad H., Lundberg I. E., and Alexanderson H., Improved exercise performance and increased aerobic capacity after endurance training of patients with stable polymyositis and dermatomyositis, *Arthritis Res. Ther.*, **15**: R83 (2013)
 - 6) Alemo Munters L., Loell I., Ossipova E., Raouf J., Dastmalchi M., Lindroos E., Chen Y. W., Esbjornsson M., Korotkova M., Alexanderson H., Nagaraju K., Crofford L. J., Jakobsson P. J., and Lundberg I. E., Endurance Exercise Improves Molecular Pathways of Aerobic Metabolism in Patients With Myositis, *Arthritis Rheumatol.*, **68**: 1738-1750 (2016)
 - 7) de Oliveira D. S., Misse R. G., Lima F. R., and Shinjo S. K., Physical exercise among patients with systemic autoimmune myopathies, *Adv. Rheumatol.*, **58**: 5 (2018)
 - 8) Yamada M., Iwata M., Warabi E., Oishi H., Lira V. A., and Okutsu M., p62/SQSTM1 and Nrf2 are essential for exercise-mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle, *FASEB J.*, **33**: 8022-8032 (2019)
 - 9) Himori K., Ashida Y., Tatebayashi D., Abe M., Saito Y., Chikenji T., Westerblad H., Andersson D. C., and Yamada T., Eccentric resistance training ameliorates muscle weakness in a mouse model of idiopathic inflammatory myopathies, *Arthritis Rheumatol.*, **73**: 848-857 (2021)
 - 10) Rayavarapu S., Coley W., Kinder T. B., and Nagaraju K., Idiopathic inflammatory myopathies: pathogenic mechanisms of muscle weakness, *skelet. muscle*, **3**: 13 (2013)
 - 11) Matsumoto G., Shimogori T., Hattori N., and Nukina N., TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation, *Hum. Mol. Genet.*, **24**: 4429-4442 (2015)
 - 12) Bartolome F., Esteras N., Martin-Requero A., Boutoleau-Bretonniere C., Vercelletto M., Gabelle A., Le Ber I., Honda T., Dinkova-Kostova A. T., Hardy J., Carro E., and Abramov A. Y., Pathogenic p62/SQSTM1 mutations impair energy metabolism through limitation of mitochondrial substrates, *Sci. Rep.*, **7**: 1666 (2017)